1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор предназначен для выявления суммарных антител (IgM, IgG, IgA) к вирусу иммунодефицита человека первого и второго типа (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антигена p24 вируса иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа, в том числе на ранних этапах инфекции.

Набор предназначен для диагностики in vitro.

Анализ может быть проведен как с использованием автоматических пипеток и стандартного оборудования для ИФА, так и на автоматических иммуноферментных анализаторах.

1.2 ВИЧ – трансмиссивная инфекция, которая преимущественно передается половым путем, через инфицированные продукты крови, недостаточно дезинфицированные медицинские инструменты, а также от матери к ребенку. В основе патогенеза заболевания лежит прогрессирующий иммунодефицит, который может привести к активации оппортунистических инфекций и развитию опухолевых процессов. Поражение иммунной системы при ВИЧ-инфекции носит системный характер, сопровождаясь глубокой супрессией Т и В-звеньев клеточного иммунитета, что определяет клиническую картину заболевания. Терминальная стадия ВИЧ-инфекции получила название «синдром приобретенного иммунодефицита» (СПИД) и характеризуется тяжелым угнетением иммунитета.

Средства вакцинопрофилактики ВИЧ-инфекции отсутствуют. Существующие методы противовирусной терапии не обеспечивают излечения от СПИДа, они позволяют лишь улучшить качество и продолжительность жизни больных.

Наиболее распространенными разновидностями вируса являются ВИЧ-1 и ВИЧ-2, которые гомологичны по аминокислотному составу на (40-60) %.

Свободный антиген p24 ВИЧ-1 появляется в крови раньше специфических антител (чаще всего на (11-14) день после инфицирования), затем его концентрация снижается и вновь повышается в терминальной стадии заболевания со снижением уровня нейтрализующих его антител.

Ранние антитела к основному белку p24 ВИЧ-1, продукту гена gag, выявляются методом ИФА на (3-6) неделе после заражения. Наиболее иммуногенными являются гликопротеины – продукты гена env: gp160, gp120 и gp41, антитела к которым, как правило, появляются позднее.

Набор «ИФА-ВИЧ /2 АТ-АГ» 4-го поколения позволяют обнаруживать не только специфические антитела, но и антиген p24 ВИЧ-1, что достигается введением в систему моноклональных антител к антигену p24 ВИЧ-1. Такая конфигурация повышает чувствительность набора и позволяет выявлять ВИЧ в более ранние сроки, когда антитела к вирусу еще отсутствуют.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Набор выпускается в трех вариантах комплектации:

- Т1-12 – один стриповый планшет, 1 постановка - 8 лунок, количество постановок 12; количество анализов – 96 (включая контроли);
- Т2-12 – два стриповых планшета, 1 постановка - 16 лунок, количество постановок 12; количество анализов – 192 (включая контроли);
- Т5-15 – пять стриповых планшетов, 1 постановка - 32 лунки, количество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

постановок 15; количество анализов – 480 (включая контроли).

2.2 Состав наборов при различной комплектации приведен в таблице 1.

Таблица 1 – Состав наборов

Наименование	Количество		
	Т1-12	Т2-12	Т5-15
Иммуносорбент	1 планшет	2 планшета	5 планшетов
Концентрат конъюгата № 1	(1,0±0,1) мл, 1 микропробирка или флакон	(1,6±0,1) мл, 1 микропробирка или флакон	(3,5±0,5) мл, 1 флакон
Концентрат конъюгата № 2	(1,5±0,1) мл, 1 микропробирка или флакон	(1,5±0,1) мл, 2 микропробирки или (3,0±0,5) мл, 1 флакон*	(7,0±0,5) мл, 1 флакон или (3,5±0,5) мл, 2 флакона
Положительная контрольная сыворотка АТ ($К^+$-АТ)	(1,5±0,1) мл, 1 микропробирка или флакон	(2,0±0,1) мл, 1 микропробирка или флакон	(4,0±0,5) мл, 1 флакон
Положительная контрольная сыворотка АГ ($К^+$-АГ)	(1,5±0,1) мл, 1 микропробирка или флакон	(2,0±0,1) мл, 1 микропробирка или флакон	(4,0±0,5) мл, 1 флакон
Отрицательная контрольная сыворотка ($К^-$)	(2,5±0,5) мл, 1 флакон	(4,0±0,5) мл, 1 флакон	(10,0±0,5) мл, 1 флакон
Раствор для разведения конъюгата № 1 (РРК-1)	(10,0±0,5) мл, 1 флакон	(16,0±1,0) мл, 1 флакон	(35,0±1,0) мл, 1 флакон
Раствор для разведения конъюгата № 2 (РРК-2)	(15,0±1,0) мл, 1 флакон	(30,0±1,0) мл, 1флакон	(70,0±1,5) мл, 1флакон
Концентрат промывочного раствора (КПР)	(60,0±1,0) мл, 1 флакон или (30,0±1,0) мл, 2 флакона	(110,0±1,5) мл, 1 флакон	(125,0±2,0) мл, 2 флакона или (250,0±2,0) мл, 1 флакон
ТМБ-субстрат	(14,0±1,0) мл, 1 флакон	(28,0±1,0) мл, 1флакон	(60,0±1,0) мл, 1 флакон или (30±1,0) мл, 2 флакона*
Стоп-реагент	(14,0±1,0) мл, 1 флакон	(28,0±1,0) мл, 1 флакон	(60,0±1,0) мл, 1 флакон или (30,0±1,0) мл, 2 флакона*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Наименование	Количество		
	Т1-12	Т2-12	Т5-15
Клейкая пленка	3 шт.	6 шт.	15 шт.
* В наборах для работы в автоматических иммуноферментных анализаторах			

Примечания:

1 По согласованию с заказчиком дополнительно в комплект поставки набора могут входить ванночки для реагентов в количестве 3 шт., 6 шт. или 15 шт.

2. Комплект поставки набора указывается в договоре на поставку.

2.3 Принцип работы набора основан на методе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), «сэндвич» вариант.

Отличительной особенностью набора 4-го поколения является использование сочетания полноразмерных и укороченных рекомбинантных и синтетических ВИЧ-специфических антигенных конструкций в составе иммуносорбента и иммуноферментного коньюгата, а также введение мощной системы биотин-стрептавидинового усиления специфического сигнала. Все это повысило чувствительность набора и позволило выявлять ВИЧ в более ранние сроки, когда антитела к вирусу еще отсутствуют.

Иммуносорбент представляет собой полистирольный планшет, в лунках которого сорбированы моноклональные антитела (МКАТ) к антигену р24 ВИЧ-1 и рекомбинантные антигены Env-1 и Env-2 (аналоги антигенов ВИЧ-1 и ВИЧ-2).

Конъюгат № 1 представляет собой смесь биотинилированных конъюгатов на основе МКАТ к антигену р24 ВИЧ-1 и аналогов вирусных антигенов Env-1 и Env-2.

Конъюгат № 2 представляет собой смесь пероксидазных конъюгатов на основе стрептавидина и аналогов антигенов ВИЧ.

При внесении в лунки планшета исследуемых образцов и конъюгата №1 антиген р24 ВИЧ-1 из исследуемого образца связывается с МКАТ к антигену р24 ВИЧ-1 как иммуносорбента, так и биотинилированного конъюгата. Специфические антитела взаимодействуют одновременно с антигенами Env-1 и Env-2 иммуносорбента и биотинилированных конъюгатов. Образовавшиеся иммунные комплексы антиген-антитело выявляются пероксидазным конъюгатом стрептавидина (конъюгат № 2). А специфические антитела, не прореагировавшие с биотинилированными конъюгатами коньюгата № 1, выявляются пероксидазными конъюгатами антигенов ВИЧ конъюгата № 2 (во избежание «хук-эффекта»).

После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляют раствор проявителя. Пероксидазную реакцию останавливают стоп-реагентом и измеряют оптическую плотность смеси в лунках в двухволновом режиме (450 нм относительно 620 нм), которая пропорциональна концентрации ВИЧ-специфических антител и антигена р24 ВИЧ-1 в исследуемых образцах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 Присутствие в наборе «ИФА-ВИЧ 1/2 АТ-АГ» некоторых биологических компонентов, источником которых является человек (положительная и отрицательная сыворотки), химикатов, а также работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), с отработанными растворами и жидкостями,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора.

3.2 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать гемоконтактные инфекции.

3.3 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2], [3], [4]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [5].

3.4 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.5 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

3.6 Все отработанные растворы, подлежащие утилизации, необходимо обрабатывать 6 % раствором перекиси водорода и выдерживать при комнатной температуре в течение 3 ч.

3.7 Все твердые отходы необходимо собирать в специальный контейнер и автоклавировать в течение 1 ч при температуре (126±2) °С и давлении (0,15±0,02) МПа.

3.8 Инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности столов необходимо обрабатывать 70 % этиловым спиртом либо дезинфицирующими средствами.

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток (плазмы), содержащие агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Собранные образцы сывороток или плазмы хранят при температуре (2-8) °С в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже минус 20 °С) не более двух раз. Каждый образец сыворотки (плазмы), а также реагенты набора необходимо отбирать чистым наконечником.

4.2 Необходимо помнить, что образцы с азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией, повышенным содержанием билирубина, бактериальным проростом, а также длительно хранившиеся без замораживания, не пригодны для анализа.

4.3 Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- температура в помещении, где проводится анализ, должна быть (18-25) °С;
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность;
- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- не допускается использование реагентов с нарушением герметичности упаковки;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;

- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;

- использовать только новые наконечники для внесения каждого образца и реагента;

- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;

- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;

- не допускается проведение анализа в присутствии паров перекиси водорода, кислот, щелочей, альдегидов, хлорсодержащих соединений, а также пыли, которые могут снижать ферментативную активность конъюгата;

- ферментная реакция очень чувствительна к ионам металлов, поэтому не допускается контакт реагентов с металлами;

- раствор ТМБ-субстрата перед использованием должен быть бесцветным, при его окрашивании необходимо заменить его новым;

- не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и ТМБ-субстрата;

- необходимо постоянно проверять точность дозировки и следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 Для проведения анализа необходимо использовать следующее оборудование:

- автоматический анализатор для ИФА открытого типа;

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм или работающий в двухволновом режиме при 450 нм и при длине волны сравнения 620 нм;

- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);

- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,02 до 5,00 мл (от 20 до 5000 мкл);

- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,050 до 0,300 мл (от 50 до 300 мкл);

- суховоздушный термостат, поддерживающий температуру (37±2) °С;

- мерные цилиндры вместимостью 25, 50, 250 и 1000 мл;

- стаканы стеклянные вместимостью 500 и 2000 мл;

- ванночки для реагентов;

- флаконы пластмассовые вместимостью 4, 20 мл;

- бумага фильтровальная;

- перчатки резиновые хирургические;

- дезинфицирующие средства;

- перекись водорода 6 %;

- спирт этиловый 70 %;

- вода дистиллированная или деионизованная;

- контейнер для сбора твердых отходов;

- контейнер для слива жидких отходов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6 ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцы сывороток или плазмы крови, в том числе полученных с помощью антикоагулянта (К2 ЭДТА, К3 ЭДТА, цитрата натрия и т.д.) или активатора свертывания крови (в комплексе с разделяющим гелем или без него), могут храниться до анализа не более трех суток при температуре (2-8) °С. Допускается хранение образцов в замороженном состоянии при температуре ниже минус 20 °С в течение трех месяцев, при температуре минус 70 °С в течение двух лет. Для предупреждения осаждения фибрина плазму необходимо быстро разморозить в течение нескольких минут при температуре (38-40) °С на водяной бане. Не использовать сыворотки или плазмы, которые замораживались/размораживались более двух раз. Размороженные образцы сыворотки (плазмы) после оттаивания тщательно перемешать пипетированием в течение не менее 1 мин для достижения однородности.

Образцы, содержащие агрегаты и осадок, перед анализом осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 1900 g (2500-3000 об/мин).

7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

(из расчета на 1 планшет)

Расчет реагентов для необходимого количества стрипов приведен в таблице 2 и в таблице 3.

7.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

7.2 Приготовление промывочного раствора (разведение в 26 раз)

7.2.1 Если КПР содержит осадок в виде кристаллов, его необходимо перед использованием прогреть при температуре (35-37) °С до полного растворения кристаллов.

7.2.2 Содержимое флакона с КПР интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с. Отобрать 48 мл раствора в стакан вместимостью 2000 мл, добавить 1200 мл дистиллированной воды и перемешать раствор.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить в течение 1 мес. при температуре (2-8) °С или 36 ч при (18-25) °С в чистой, плотно закрытой емкости.

7.3 Приготовление раствора конъюгата № 1 в рабочем разведении (разведение в 11 раз)

В чистый флакон вместимостью 20 мл отобрать 0,6 мл (600 мкл) концентрата конъюгата № 1 (синий цвет), добавить 6 мл РРК-1 (синий цвет). Содержимое флакона тщательно перемешать пипетированием в течение не менее 1 мин, не допуская образования пены.

ВНИМАНИЕ! Раствор конъюгата № 1 в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием.

7.4 Приготовление раствора конъюгата № 2 в рабочем разведении (разведение в 11 раз)

В чистый флакон вместимостью 20 мл отобрать 1,2 мл (1200 мкл) концентрата конъюгата № 2 (красный цвет), добавить 12 мл РРК-2 (красный цвет). Содержимое флакона тщательно перемешать пипетированием в течение не менее 1 мин, не допуская образования пены.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВНИМАНИЕ! Раствор конъюгата № 2 в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием.

Таблица 2 – Расход реагентов набора

Количество стрипов	Промывочный раствор		Раствор конъюгата № 1		Раствор конъюгата № 2		ТМБ-субстрат, мл	Стоп-реагент, мл
	КПР, мл	Дист. вода, мл	Концентрат конъюгата № 1, мкл	РРК-1, мл	Концентрат конъюгата № 2, мкл	РРК-2, мл		
1	4	100	50	0,5	100	1	1	1
2	8	200	100	1	200	2	2	2
3	12	300	150	1,5	300	3	3	3
4	16	400	200	2	400	4	4	4
5	20	500	250	2,5	500	5	5	5
6	24	600	300	3	600	6	6	6
7	28	700	350	3,5	700	7	7	7
8	32	800	400	4	800	8	8	8
9	36	900	450	4,5	900	9	9	9
10	40	1000	500	5	1000	10	10	10
11	44	1100	550	5,5	1100	11	11	11
12	48	1200	600	6	1200	12	12	12

Таблица 3 – Расход реагентов набора для постановки ИФА на автоматическом анализаторе открытого типа

Количество стрипов	Промывочный раствор		Раствор конъюгата № 1		Раствор конъюгата № 2		ТМБ-субстрат, мл	Стоп-реагент, мл
	КПР, мл	Дист. вода, мл	Концентрат конъюгата № 1, мкл	РРК-1, мл	Концентрат конъюгата № 2, мкл	РРК-2, мл		
4	16	400	200	2	400	4	4	4
8	32	800	400	4	800	8	8	8
12	48	1200	600	6	1200	12	12	12

7.4 Хранение реагентов после вскрытия упаковки

Флаконы с реагентами закрывать крышками сразу после использования, предупреждая их контаминацию.

В ходе анализа допускается хранение реагентов в течение 8 ч при температуре (18-25) °С в защищенном от света месте.

Все неиспользованные компоненты набора хранить в плотно закрытой первичной упаковке при (2-8) °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности.

8 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВАНИЮ ПЛАНШЕТА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- для промывания планшета рекомендуется использовать автоматическое или полуавтоматическое устройство для промывания планшетов – вошер, в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-ми канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них, лунки должны заполняться промывочным раствором до краев ((0,300-0,350) мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

- промывочный раствор должен находиться в лунках не менее 40 с;

- после последней аспирации в лунках не должно быть остатков жидкости. При необходимости удалить остатки влаги, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге;

Некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

9 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА ПРИ РУЧНОЙ ПОСТАНОВКЕ

Продолжительность анализа – 2 ч.

9.1 Перед началом работы иммуносорбент освободить от упаковочного пакета и подготовить необходимое количество стрипов. Составить протокол маркировки лунок из расчета, что все образцы сывороток/плазм крови, а также положительные контрольные сыворотки набора ($К^+$-АТ) и ($К^+$-АГ) ставятся в дубликатах. Отрицательная контрольная сыворотка набора ($К^-$) ставится не менее, чем в трех лунках.

9.2 В каждую лунку планшета внести по 0,03 мл (30 мкл) раствора конъюгата № 1 в рабочем разведении (синий цвет), приготовленного по п. 7.3.

9.3 В лунки планшета внести по 0,07 мл (70 мкл):

- положительных контрольных сывороток ($К^+$-АТ) и ($К^+$-АГ) – каждая контрольная сыворотка в предназначенные для нее лунки;

- отрицательной контрольной сыворотки ($К^-$) – в предназначенные для нее лунки;

- образцов исследуемых сывороток или плазм крови человека (X_i). Каждый образец – в отдельные предназначенные для него лунки.

ВНИМАНИЕ! При внесении образцов и контрольных сывороток необходимо осторожно пипетировать смесь в лунках. При этом происходит изменение цвета раствора, что позволяет контролировать внесение образца в лунку. Контрольные сыворотки ($К^+$-АТ), ($К^+$-АГ) и ($К^-$) вносят в последнюю очередь.

9.4 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре (37±2) °С в течение 60 мин без встряхивания.

9.5 Удалить содержимое из всех лунок с помощью вошера или 8-ми канальной пипетки, промыть все лунки планшета 6 раз по 0,35 мл (350 мкл) промывочным раствором, приготовленным по п. 7.2, и после последней аспирации удалить остатки влаги, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

9.6 Во все лунки планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора конъюгата № 2 в рабочем разведении (красный цвет), приготовленного по п. 7.4.

9.7 Планшет заклеить новой пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при температуре (18-25) °С в течение 30 мин без встряхивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.8 Удалить содержимое из всех лунок с помощью вошера или 8-ми канальной пипетки, промыть все лунки планшета 6 раз по 0,35 мл (350 мкл) промывочным раствором, приготовленным по п. 7.2, и после последней аспирации удалить остатки влаги, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

9.9 Во все лунки планшета внести по 0,1 мл (100 мкл) ТМБ-субстрата.

ВНИМАНИЕ! ТМБ-субстрат перед использованием должен представлять собой прозрачную бесцветную жидкость.

9.10 Планшет заклеить новой пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при температуре (18-25) °С в темном месте в течение 30 мин без встряхивания.

9.11 Остановить цветную реакцию путем внесением во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента (в той же последовательности внесения, что и ТМБ-субстрат).

9.12 Не позже, чем через 5 мин после остановки цветной реакции, определить оптическую плотность (ОП) в лунках в двухволновом режиме при длине волны 450 нм относительно 620 нм.

Возможно измерение ОП в одноволновом режиме: при длине волны 450 нм относительно пустой лунки (бланк). Необходимо предусмотреть пустую лунку при анализе. При работе в одноволновом режиме снижается чувствительность анализа.

9.13 Последовательность операций анализа приведена в таблице 4.

Таблица 4 – Последовательность операций анализа

Лунки (в дубликатах)	Последовательность операций						
	Раствор коньюгата №1 (синий), мкл	K^+-АТ; K^+-АГ; K^- и исследуемые сыворотки/ плазмы крови человека, мкл	При внесении осторожно пипетировать смесь в лунках. Контроли вносят в последнюю очередь!	Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате при (37±2) °С в течение 60 мин без встряхивания.	С помощью вошера или 8-ми канальной пипетки удалить содержимое	Промывочный раствор мкл	Удалить промывочный раствор. Повторить 5 раз стадию промывки.
K^+-АТ	30	70				350	
K^+-АГ	30	70				350	
K^-	30	70				350	
X_i	30	70				350	
После последней аспирации удалять остатки влаги, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге							

Продолжение таблицы 4

Лунки (в дубликатах)	Последовательность операций							
	Раствор коньюгата №2 (красный) мкл	Планшет заклеить новой пленкой и инкубировать при (18-25) °С	С помощью вошера или 8-ми канальной пипетки удалить	Промывочный раствор мкл	Удалить промывочный раствор. Повторить 5 раз	ТМБ-субстрат, мкл	Планшет заклеить новой пленкой и инкубировать при (18-25) °С в темном месте в течение	Стоп-реагент, мкл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

$К^+$-АТ	100	в течение 30 мин без встряхивания	содержимое	350	стадию промывки.	100	30 мин без встряхивания	100
$К^+$-АГ	100			350		100		100
$К^-$	100			350		100		100
X_i	100			350		100		100
Через 5 мин измерить ОП при длине волны 450 нм относительно 620 нм								

10 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА С ПОМОЩЬЮ АВТОМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА ОТКРЫТОГО ТИПА

10.1 Включите анализатор и задайте программу проведения ИФА.

10.2 Приготовленный промывочный раствор залейте в предназначенную для него емкость, входящую в комплект к анализатору.

10.3 В специальные штативы анализатора поместите готовые к использованию реагенты тест-системы (($К^+$-АТ), ($К^+$-АГ), ($К^-$), ТМБ-субстрат, стоп-реагент) и приготовленные растворы конъюгатов.

10.4 Емкости с исследуемыми образцами (не менее 300 мкл) установите в соответствующие штативы анализатора.

10.5 Поместите в анализатор необходимое количество планшетов (стрипов).

10.6 Проведите постановку ИФА в соответствии с одной из нижеприведенных процедур. В зависимости от технических характеристик используемого автоматического иммуноферментного анализатора возможно использование двух вариантов дальнейшей процедуры анализа:

Процедура 1

После соответствующего программирования автоматический анализатор выполняет процедуру анализа как при вышеописанной ручной постановке: инкубация без шейкера при температуре (37±2) °С и (18-25) °С, с продолжительностью анализа 2 ч.

Данная процедура анализа валидирована для ИФА с использованием автоматических анализаторов (в частности типа EVOLIS, EVOlyzer).

Процедура 2

После соответствующего программирования автоматический анализатор выполняет процедуру анализа со следующими отличиями:

- все инкубации осуществляются при одной температуре (37±2) °С на шейкере (инкубация с ТМБ-субстратом без шейкера);
- сокращенное время инкубации с коньюгатом №1 – 40 мин;
- сокращенное время инкубации с конъюгатом №2 – 20 мин.

Продолжительность анализа – 1 ч 30 мин.

Данная процедура анализа валидирована для ИФА с использованием автоматических анализаторов (в частности типа EVOLIS, EVOlyzer, ChemWell Combo).

11 СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ВНЕСЕНИЯ РЕАГЕНТОВ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

На этапах анализа всех процедур после внесения раствора коньюгата №1, исследуемых образцов, раствора коньюгата №2, возможно проведение спектрофотометрической верификации внесении реагентов, как описано ниже.

11.1 Верификация внесения коньюгата №1

После внесения в лунки планшета по 30 мкл раствора коньюгата №1 верификация проводится при длине волны 405 нм. ОП раствора в лунке должна быть не менее 0,2. Более низкие значения свидетельствуют об отсутствии или недостаточном количестве коньюгата №1 в лунках.

11.2 Верификация внесения исследуемых образцов и контролей

После внесения поверх коньюгата №1 по 70 мкл контролей и исследуемых образцов и перемешивания содержимого лунок верификация проводится при длине волны 405 нм. ОП раствора в лунке должна быть не менее 0,5. Более низкие значения свидетельствуют об отсутствии или недостаточном количестве образцов в лунках.

11.3 Верификация внесения конъюгата №2

После внесения в лунки планшета по 100 мкл раствора конъюгата №2 верификация проводится при длине волны 405 нм. ОП раствора в лунке должна быть не менее 0,35. Более низкие значения свидетельствуют об отсутствии или недостаточном количестве конъюгата №2 в лунках.

12 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

12.1 Рассчитать среднее арифметическое значение ОП для лунок с отрицательной контрольной сывороткой – $ОП_{ср}$ ($К^-$).

Из полученных результатов исключить ОП ($К^-$), которые больше 0,2 или более чем вдвое превышает $ОП_{ср}$ ($К^-$). Рассчитать $ОП_{ср}$ ($К^-$) по оставшимся значениям.

12.2 По результатам анализа $ОП_{ср}$ ($К^-$) должна быть не выше 0,2 ОЕ, а ОП ($К^+$-АТ) и ($К^+$-АГ) должна быть не ниже 0,6 ОЕ.

12.3 Расчет параметров граничного значения ОП (ГЗ).

Значение ОП (ГЗ) рассчитывают, добавляя константную величину 0,1 к значению $ОП_{ср}$ ($К^-$).

$$ГЗ = ОП_{ср} (К^-) + 0,1$$

12.4 Оценка результатов анализа

Результаты анализа считаются положительными, если значение ОП исследуемого образца сыворотки или плазмы крови человека больше ГЗ.

Результаты анализа считаются отрицательными, если значение ОП исследуемого образца сыворотки или плазмы крови человека меньше ГЗ.

Значения ОП ($К^-$) и исследуемых образцов сывороток или плазмы крови человека меньше 0,00 (т.е. со знаком «–») при расчетах ГЗ и анализе результатов считать равными нулю.

Образцы сывороток (плазмы), давшие положительный результат, необходимо исследовать повторно не менее чем в двух лунках иммуносорбента:

- образцы положительные в одной и более лунках следует считать положительными;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- образцы отрицательные в двух и более лунках следует считать отрицательными.

Высокая чувствительность набора «ИФА-ВИЧ 1/2 АТ-АГ», наличие в исследуемых образцах сыворотки или плазмы крови кросс-реагирующих и интерферентных факторов, способных неспецифически взаимодействовать с реагентами набора, могут приводить к ложноположительным результатам. В связи с этим, все образцы, которые при повторном анализе были положительными, должны быть проверены верификационными (подтверждающими) тестами.

Ложноотрицательные результаты могут быть получены на ранних стадиях ВИЧ-инфекции, когда в крови еще отсутствуют антиген р24 ВИЧ-1 и специфические антитела к вирусу или их концентрация настолько мала, что находится вне предела чувствительности набора.

13 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

13.1 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность набора «ИФА-ВИЧ 1/2 АТ-АГ» составляет:

- по 1-му Международному стандарту антигена HIV-I p24 (NIBSC, код 90/636) – не более 0,7 МЕ/мл;
- по «Стандарту АГ(+) ВИЧ-1 р24» («МБС», Россия) – не более 20 пг/мл.

13.2 Диагностическая чувствительность

Чувствительность набора «ИФА-ВИЧ 1/2 АТ-АГ» при тестировании на стандартных панелях положительных сывороток составляет 100 %.

При исследовании панели сывороток «Стандарт АТ(+) ВИЧ-1» («МБС», Россия), включающей 16 образцов с антителами к ВИЧ-1 в различных концентрациях, набором «ИФА-ВИЧ 1/2 АТ-АГ» были обнаружены специфические антитела во всех образцах.

При исследовании панели сывороток «Стандарт АТ(+) ВИЧ-2 («МБС», Россия), включающей 8 образцов, содержащих антитела к ВИЧ-2 в различных концентрациях, набором «ИФА-ВИЧ 1/2 АТ-АГ» были обнаружены специфические антитела во всех образцах.

При исследовании панели сывороток «Стандарт АГ(+) ВИЧ-1 р24» («МБС», Россия), включающей 10 образцов, содержащих антиген р24 ВИЧ-1 в различных концентрациях, набором «ИФА-ВИЧ 1/2 АТ-АГ» были обнаружены специфические антигены во всех 4 образцах, содержащих антиген р24 ВИЧ-1 в концентрациях выше и равной 20 пг/мл.

13.3 Специфичность

Специфичность набора «ИФА-ВИЧ 1/2 АТ-АГ» при тестировании на стандартной панели отрицательных сывороток составляет 100 %.

При исследовании стандартной панели сывороток «Стандарт АТ(-) ВИЧ» («МБС», Россия), включающей 20 образцов, не содержащих антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и антиген р24 ВИЧ-1, все образцы определены отрицательными.

14 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

14.1 Набор должен храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Замораживать компоненты набора запрещается.

14.2 Срок годности набора – 18 месяцев.

14.3 Для отбора и добавления компонентов рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимость результатов пипетирования.

14.4 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

Пояснения к символам

Графический символ	Его значение и объяснение
SN	**Серийный номер** Настоящий символ сопровождается указанием серийного номера изготовителя
	**Использовать до** Настоящий символ сопровождается датой, указывающей, что изделие рекомендуется использовать до истечения установленного срока; дата состоит из четырех цифр, указывающих год, двух цифр, указывающих месяц, и двух цифр, указывающих день
IVD	**Изделие для диагностики in vitro**
	**Ограничение температуры** Рядом с верхней и нижней горизонтальными линиями указывается верхняя и нижняя границы температурного диапазона
	**Изготовитель** Настоящий символ сопровождается информацией о наименовании и адресе изготовителя
	**Обратитесь к руководству по эксплуатации** Настоящий символ отсылает к руководству по эксплуатации для получения информации, необходимой для надлежащего применения изделия
	**Содержимого достаточно для проведения n-тестирований** Настоящий символ сопровождается указанием количества определений

УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» ул. Академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.3, 220141, г. Минск, Республика Беларусь.
Тел./факс +375-17-396 89 87
E-mail: hopmang.bel@gmail.com http://www.hopiboh.org
По вопросам, касающимся качества набора, обращаться в ОТК, тел. +375-17-396-87-38

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Библиография

[1] СП 17-69 РБ-98
«Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 29.04.1998 г. № 18 (ред. от 03.04.17)

[2] Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД. Утвержден приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 16.12.1998 г. № 351

[3] Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно патогенными микроорганизмами и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 г. № 2

[4] Санитарные нормы и правила «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.02.2013 г. № 11

[5] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 25.11.2002 г. № 165 «О проведении дезинфекции и стерилизации в учреждениях здравоохранения»

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru